



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93117148.2

[51]Int.Cl⁵

C07D307 / 88

[43]公开日 1995 年 3 月 15 日

[22]申请日 93.9.9

[71]申请人 中国医学科学院药物研究所

地址 100050北京市先农坛街1号

[72]发明人 冯亦璞 杨峻山 张均田

杨靖华 胡 盾

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程 伟 刘国平

A61K 31 / 34

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 芹菜甲素作为制备预防和治疗脑缺血引起的疾病的药物中的应用

[57]摘要

本发明提供芹菜甲素的新用途。该化合物能有效地预防和治疗脑缺血所引起的疾病，特别是对缺血性脑神经无损伤和坏死能起到明显的保护作用。

权 利 要 求 书

1、芹菜甲素作为制备预防和治疗哺乳动物或人类脑缺血引起的疾病的药中的应用。

2、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为逆转和降低哺乳动物或人类局部脑缺血所引起的脑梗塞面积和神经缺失的药中的应用。

3、如权利要求1所述的应用，其特征在于：芹菜甲素作为降低哺乳动物或人类局部脑缺血所引起的脑水肿的药中的应用。

4、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为预防哺乳动物或人类脑卒中并降低脑卒中后的死亡率及神经缺失的药中的应用。

5、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为改善哺乳动物或人类局部脑缺血所引起的记忆障碍的药中的应用。

6、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为改善哺乳动物或人类全脑缺血的能量代谢耗竭的药中的应用。

7、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为抑制哺乳动物或人类全脑缺血及重灌期纹状体细胞外液腺苷、肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤含量升高的药中的应用。

8、如权利要求1所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为抑制哺乳动物或人类脑缺血期纹状体细

胞外液**DA**和**DOPAC**含量升高和降低甘氨酸含量的药中的应用。

9、如权利要求**1**所述的应用，其特征在于：所述的芹菜甲素作为治疗哺乳动物或人类脑外伤导致脑缺血引起的神经症状的药中的应用。

说明书

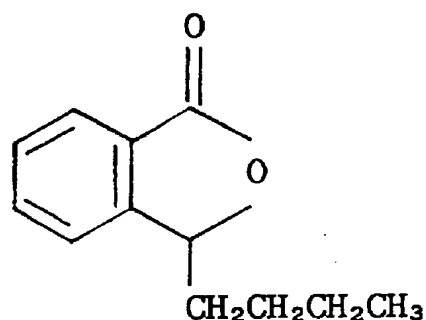
芹菜甲素作为制备预防和治疗脑缺血引起的疾病的药物中的应用

本发明涉及芹菜甲素的用途，特别是在制备预防和治疗脑缺血引起的疾病，尤其是对缺血性脑神经元损伤和坏死的药物中的用途。

目前用于治疗脑缺血引起疾病的药物很多，但真正有效者为数不多。现有药物尼莫地平对脑缺血有预防作用，但治疗作用不肯定。兴奋性氨基酸拮抗剂MK801疗效肯定，但毒副作用大，不能用于临床，都可喜，雅伴和脑复康多用于治疗脑卒中后遗症，但疗效也不够理想。

芹菜甲素 (3-n-butylphthalide) (1) 是一个合成的天然药物，Bjeldanes等于1977年报道芹菜甲素及芹菜乙素等有中枢镇静作用 (Bjeldanes LF: J. Org. Chem. 42: 2333, 1977)。杨峻山于1978年从芹菜种子中分离出L-芹菜甲素 (L-正丁基苯酐) 和芹菜乙素 (L-正丁基-4, 5-二氢苯酐)

(杨峻山, 陈玉武; 药学通报, 1984, 31: 671)。1980年杨靖华人工合成DL-芹菜甲素。



芹菜甲素 (3-n-butylphthalide)

天然存在的芹菜甲素为左旋体，而合成的为外消旋体。但无论是天然的还是人工合成的芹菜甲素，文献中均报告了其具有广谱抗惊作用，对电休克，听源性惊厥，五甲稀四氮唑及马桑内酯引起的惊厥具有对抗作用，并能增强小鼠学习记忆能力，对马桑内酯引起的惊厥所致的大鼠海马CA1区病理改变有改善作用（于澍仁等，药学学报 1988, 19(8), 566；于澍仁等，药学学报 1988, 23(9), 656；于澍仁等，中国药理学报 1988, 9: 385；于澍仁等，药学学报 1984, 19(7), 486；于澍仁等，药学通报 1985, 20, 187）。但未见芹菜甲素有治疗脑缺血引起疾病，如脑血管疾病作过的报道。

本发明的目的就在于提供芹菜甲素的新用途，即，芹菜甲素在制备预防和治疗脑缺血引起的疾病，尤其是缺血性脑神经元损伤和坏死的药物中的应用。本发明将结合下述研究结果进一步详细叙述芹菜甲素作为预防和

治疗脑缺血引起的疾病，特别是对缺血性脑神经元损伤和坏死起到明显的保护作用的药物。

为完成本发明的发明目的，实际上本发明涉及芹菜甲素作为制备逆转或降低哺乳动物或人类局部脑缺血引起的脑梗塞面积和神经缺失的药中的应用。

本发明还涉及芹菜甲素作为制备降低哺乳动物或人类局部脑缺血引起的脑水肿的药中的应用。

本发明还涉及芹菜甲素作为制备预防哺乳动物或人类脑卒中和降低脑卒中后的死亡率及神经缺失的药中的应用。

本发明涉及芹菜甲素作为改善哺乳动物或人类局部脑缺血引起的记忆障碍的药中的应用。

本发明还进一步涉及芹菜甲素作为治疗哺乳动物或人类因脑外伤而导致脑缺血所引起的神经症状的药中的应用。

本发明进一步涉及芹菜甲素作为改善哺乳动物或人类全脑缺血的能量代谢耗竭的药中的应用。

本发明还进一步涉及芹菜甲素作为抑制哺乳动物或人类全脑缺血及重灌期纹状体细胞外液腺苷、肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤含量升高的药中的应用。

本发明还涉及芹菜甲素作为抑制哺乳动物或人类脑缺血期纹状体细胞外液DA和DOPAC含量升高和降低甘氨酸含量的药中的应用。

本发明对现有技术中已存在的芹菜甲素的用途开拓了一个新的应用领域，研究结果表明，芹菜甲素具有如

下作用：

(1) 能逆转或降低局部脑缺血大鼠脑梗塞面积和神经缺失，其治疗效果优于尼莫地平，与工具药，兴奋性氨基酸受体拮抗剂**MK801**相当，毒副作用小；

(2) 有明显降低局部脑缺血引起的脑水肿；

(3) 能降低脑卒中型自发型高血压大鼠脑卒中后的死亡率及神经缺失并具有预防作用；

(4) 能改善局部脑缺血引起的记忆障碍；

(5) 对脑外伤大鼠导致脑缺血而引起的神经症状有改善作用；

(6) 能改善小鼠完全脑缺血的能量代谢耗竭；

(7) 能抑制全脑缺血大鼠(4动脉结扎)的缺血及重灌期纹状体细胞外液腺苷，肌苷，次黄嘌呤，黄嘌呤含量升高；

(8) 能降低4动脉结扎大鼠脑缺血期纹状体细胞外液甘氨酸的含量和抑制**DA**和**DOPAC**的升高。

(9) 对急性期脑卒中病人有明显的治疗作用。

急性毒性试验、致畸、致突变等试验结果表明，芹菜甲素毒副作用较小。

研究表明，芹菜甲素作为预防和治疗脑缺血引起的疾病的药物，可以胶囊剂、注射剂等制剂形式与药用载体组合成组合物用于哺乳动物与人类，其中，以胶囊剂较为优选。小鼠剂量为皮下注射**100~200mg/kg/天**或口服**100~400mg/kg/天**，大鼠剂量为口服：**30~240mg/kg/天**或腹腔注射**10**

~ 20mg/kg/天，人类的剂量为6~12mg/kg/天。

以下结合实施例及附图详细说明本发明。附图中：

图1 (A, B) 为芹菜甲素、MK801和尼莫地平治疗给药对大鼠大脑中动脉结扎 (MCAO) 后脑梗塞面积和神经缺失的影响。

图2 (A, B) 为芹菜甲素对大鼠大脑中动脉结扎 (MCAO) 后脑梗塞面积和神经缺失的影响。

图3 (A, B) 为芹菜甲素预防给药对大鼠大脑中动脉结扎 (MCAO) 后脑梗塞面积和神经缺失的影响。

图4 (A, B) 为芹菜甲素对脑卒中型自发性高血压大鼠脑卒中的治疗作用。

图5为口服芹菜甲素对脑卒中型自发性高血压大鼠脑卒中的预防作用。

图6为口服芹菜甲素对结扎大脑中动脉 (MCAO) 引起记忆障碍大鼠主动回避次数的影响。

图7 (A, B) 为芹菜甲素对结扎大脑中动脉 (MCAO) 引起记忆障碍大鼠回避潜伏期的影响。

图8 (A-D) 为芹菜甲素对全脑缺血大鼠纹状体细胞外液嘌呤代谢物的影响。

图9为芹菜甲素对全脑缺血大鼠纹状体细胞外液氨基酸含量的影响。

实施例 1

芹菜甲素对治疗给药对大鼠大脑中动脉结扎 (MCAO) 后脑梗塞面积和神经缺失的影响

仪器:

- 1、SXP-手术显微镜 (上海医用光学仪器厂)
- 2、高频电刀 (62TZ-V型, 北京医用电子仪器厂)

动物: 雄性wistar大鼠, 由中国医学科学院动物中心提供。体重250~350g

药物: dl-芹菜甲素由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供, 含量98%, 淡黄色油状液体, 口服给药由精制食用油配制成所需浓度, 腹腔注射用tween 80配成乳剂。

MK801购自Sigma公司
尼莫地平为市售药品

方法:

为模拟临床脑卒中病人, 采用大鼠大脑中动脉结扎(MCAO)作为局部脑缺血模型。

雄性wistar大鼠, 250-350g, 腹腔注射水合氯醛麻醉 (350mg/kg), 共7组, 每组8只, 按Tamura法 (Tamura A, et al. J cereb Blood and Metab 1: 53, 1981) 行右侧MCAO, 自MCAO后15min, 分别腹腔注射芹菜甲素10, 20mg/kg, 口服40, 80mg/kg, 皮下注射尼

莫地平 1mg/kg 和腹腔注射 MK801 0.5mg/kg , 均与缺血对照组 (给溶剂) 进行比较, 用 Bederson 行为打分法进行评分 (Bederson J. B Rat middle cerebral Artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination, stroke 17 (3): 472-6), 具体方法为 (1) 健侧肩内旋, 前肢内收 0-4 分; (2) 推健侧肩阻力下降 0-3 分; (3) 肌力下降 (抓举) 0-3 分, 共 10 分, 记录术后 24 小时分数, 然后断头, 取前脑, 冠状切成 5 片, 用 TTC (Lundy E. F; J. Pharmacological methods 16: 201 1986) 染色, 测定梗塞面积, 并计算其占半球的百分数, 测定结果示于图 1。结果表明, MCAO 后 15 分钟用芹菜甲素治疗, 不管腹腔或口服给药均能明显降低脑梗塞面积和神经缺失。其作用强于尼莫地平, 而与已知抗脑缺血工具药 MK801 相当。

实施例 2

芹菜甲素对大鼠大脑中动脉结扎 (MCAO) 2 小时后脑梗塞面积和神经缺失的影响。

仪器、动物及药物同实施例 1。

方法:

具体方法同实施例1，大鼠MCAO后2小时分别口服芹菜甲素80，160，240mg/kg及溶剂（缺血对照组）共4组（括号中数字代表动物只数。观察术后24小时的神经缺失分数和梗塞面积，结果表明，MCAO后2小时芹菜甲素口服治疗，能明显降低脑梗塞面积和改善神经缺失。结果如图2所示。

实施例3

芹菜甲素预防给药对大鼠大脑中动脉结扎（MCAO）后脑梗塞面积和神经缺失的影响。

仪器、动物及药物同实施例1、2。

方法：与实施例1、2相似。给药方式分别为：

（1）在MCAO前1小时口服芹菜甲素80或160mg/kg；

（2）在MCAO前7天连续口服芹菜甲素40或80mg/kg/天；

（3）溶剂对照（缺血对照），

共5组（每组7-8只）。观察术后24小时的行为改变和梗塞面积。结果如图3所示，表明，芹菜甲素预防给药（口服）有明显降低脑梗塞面积和行为缺失的作用。

由实施例1-3可见，芹菜甲素预防给药（MCAO）前1小时，口服芹菜甲素80或160mg/kg或连续给药7天，剂量为40或80mg/kg/天）或治疗给药（于MCAO后15min腹腔注射10，2

0mg/kg或口服40, 80mg/kg; 或MCAO后2小时口服80, 160, 240mg/kg) 均能明显逆转或降低脑梗塞面积和神经缺失的作用, 且有明显的剂量效应关系(图1, 2, 3)。这一结果表明芹菜甲素具有逆转或降低缺血性神经元损伤, 改善脑缺血后神经缺失作用, 有望治疗人类脑卒中和改善脑卒中后遗症。

实施例4

芹菜甲素对大脑中动脉结扎大鼠脑水肿的影响

脑组织缺氧缺血能量耗竭, 细胞膜功能受损, 不能维持离子梯度, 引起脑组织水肿, Na堆积, K⁺浓度下降, 严重损伤神经元功能或导致神经元死亡。

动物: 雄性wistar大鼠, 体重300~350g, 由中国医学科学院动物中心提供。

药物: dl-芹菜甲素, 由中国医学科学院药物研究所协和药厂提供, 含量98%, 用精制食用油配制成所需浓度。

方法: 本实验用右侧大脑中动脉结扎(MCAO)大鼠(方法同实施例1), 引起脑水肿。于MCAO后15min口服dl-芹菜甲素80, 160, 240mg/kg, 术后24小时处死, 取前脑, 将左、右半球分别称湿重。

100℃烤24小时后称干重, 用干湿法计算脑组织水重量($[(\text{湿组织} - \text{干组织}) / \text{湿组织}] \times 100$)。

然后将组织消化(用浓消酸0.5ml和30% H_2O_2 (1:4 v/v) 在85℃消化4小时, 用HCl调pH至7.2)。用离子选择性电极连接在氧组织分析仪上(Chemical Microsensor II., Diamond General Corp. USA), 检测脑组织 Na^+ 和 K^+ 离子。

结果列于表1和表2中可见, dl-芹菜甲素能明显降低脑水和 Na^+ 含量, 增加 K^+ 含量, 说明能减轻局部脑缺血引起的脑水肿。

实施例 5

芹菜甲素对脑卒中型自发性高血压大鼠脑卒中的预防和治疗作用。

为模拟临床高血压病人引起脑卒中, 本实验用6周龄脑卒中型自发性高血压大鼠(SHRSP), 由中国医学科学院心血管病研究所实验动物科提供, 每笼4~5只动物。室温 $23 \pm 1^\circ C$, 湿度 $50 \pm 10\%$ 。光照12小时/日, 自由饮水和喂食块料或软食。实验分5组, 每组15只, 自实验开始至卒中发作, 每只动物每天进盐量由0.8g逐渐增至1.3g, 自脑卒中之日起改用无盐饮食。

药物, dl-芹菜甲素由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供, 为淡黄色油状液体, 含量为98%, 均用市售精制食用油配成所需浓度。剂量为25, 50和100mg/kg/天三个剂量组, 另设溶剂对照

组，给药体积为 1 ml/kg 。

观察指标：1、记录卒中发作时间以及卒中后存活天数；2、脑卒中后每天进行神经症状评分。评定标准如下：

1、脑卒中发作的标准：（1）单或双前肢或全身抽动，（2）出现偏瘫或全身瘫痪，腹部贴地不能站立，（3）较重者为全身细小震颤，最后爬伏软瘫，甚至死亡。

有些动物尚伴有激惹（跳或窜）或抑制现象。凡出现以上一项症状者评定为脑卒中发作。

2、神经症状的评分标准如下：

级别	症状
0	正常
1	少动或轻度激惹
2	一侧前肢或头抽动，钻笼角不动或激惹性抗进（跳或窜）
3	单侧前、后肢或单侧前肢瘫，身躯歪斜，行走困难。
4	腹部贴地不能站立，四肢瘫痪，全身细小震颤或抽搐

记录21天评定分数，进行统计处理。

具体作法是：75只雄性脑卒中型自发性高血压大鼠，每组15只，自第6周龄起每天喂0.8-0.9克食盐，以后逐步增至1.2-1.3克食盐/天，每天口服芹菜甲素25，50或100mg/kg/天，尼莫地

平 **37mg/kg/天**，对照组口服同体积溶剂对照。自第**8**周龄起开始喂药至脑卒中发生后**3**周止。自脑卒中发生后计录神经缺失分数及死亡时间。由图**4 (A, B)**表明，芹菜甲素 **100mg/kg/天**有非常明显增加脑卒中发作后的存活率和改善神经缺失作用，其作用与尼莫地平相似。提示芹菜甲素对严重高血压引起脑卒中病人有治疗作用。

图**5**显示口服芹菜甲素对脑卒中型自发性高血压大鼠脑卒中的预防作用。其中每组动物数为**15**只。

实施例 6

芹菜甲素对局部脑缺血大鼠记忆障碍的影响。

脑卒中引起缺血性脑梗塞，神经元严重损伤，功能受损，这是引起临床上脑卒中患者后遗症的主要原因。本实施例观察**d1** - 芹菜甲素对局部脑缺血引起记忆障碍的影响。

仪器：

- 1、穿梭箱：日本大正制药株式会社制造
- 2、手术显微镜**SXP**型，上海医用光学仪器生产
- 3、高频电刀：**62TZ-V**型，北京医用电子仪器厂生产

动物：

Wistar雄性大鼠，体重**250~300g**，由中国医学科学院实验动物中心提供。

药品：

d1 - 芹菜甲素由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供，为淡黄色油状液体，含量**98%**，用精制食用油配制成**10**，**30**和**100mg/ml**，灌胃给药体积为**1ml/kg**。

艾地苯醌市售

方法：

1、学习记忆获得性训练

大鼠先进行学习记忆获得性训练。穿梭箱由实验箱和自动记录打印装置组成，实验箱大小为**50×16×18cm³**，箱底部格栅为可以通电的不锈钢棍，箱底中央部有一高**1.2cm**的档板将箱底部分隔成左右两室，实验箱顶部有光源和蜂鸣音控制器，自动记录打印装置可连续自动记录动物对电刺激或条件刺激的反应和潜伏期，并将结果打印出来，训练时，将大鼠放入箱内任何一室，**10**秒后出现蜂鸣音，持续**10**秒，后**10**秒内给予电刺激（**100V**，**0.2mA**，**50Hz**，**AC**），最初动物只对电击有反应，即逃至对侧以回避电击，**10**秒后再次出现条件刺激并继之在动物所在侧施以电刺激，迫使动物跳至另一室，如此来回穿梭，当蜂鸣音呈现时，大鼠立即跳至对侧安全区以回避电击，即认为出现了主动回避反应，每隔一天训练一回，每回**20**次，约训练**4-5**回，于最后一次训练后将主动回避反应达**80%**以上的大鼠除假手术组外，均进行大脑中动脉结扎（**MCAO**）。

2、MCAO术：用**12%**水合三氯乙醛麻醉（**3**

50mg/kg, i.p), 按Tamura法进行MCAO术。大鼠侧卧位固定于手术台上, 沿外耳道与右眼眦连线的中点垂直于连线切开皮肤, 然后在手术显微镜下, 暴露颞弓, 用咬骨钳除去颞弓暴露颞前窝, 上小牵张器在颞弓和鳞状骨前联合处钻孔开一约2mm直径的小颅窗, 用双极电刀电凝大脑中动脉, 然后逐层缝合伤口。假手术组除不烧断MCA外, 其余手术均同上述步骤。术后大鼠回笼, 室温恒定在24-25℃, 术后24h后重复测定一回大鼠学习记忆的实验, 方法与大鼠学习记忆获得性实验相同。

3、分组和药物剂量

分7组, 每组8~11只: (1) 正常组; (2) 假手术组; (3) 缺血对照组 (口服同体积溶剂); (4), (5), (6) 组分别口服dl-芹菜甲素10, 30和100mg; (7) 艾地苯醌组 (口服30mg/kg)。药物于大鼠术后15min单次口服给药。术后24小时, 观察药物治疗对大鼠主动和被动回避反应潜伏期的变化值的影响, 以判断药物有否改善MCAO大鼠记忆障碍的作用。

图6显示口服芹菜甲素对结扎大脑中动脉 (MCAO) 引起记忆障碍大鼠主动回避次数 (平均值±标准差) 的影响。

图7 (A, B) 显示芹菜甲素对结扎大脑中动脉 (MCAO) 引起记忆障碍大鼠回避潜伏期 (平均值±标准差) 的影响。

结果由图6和7可见，假手术组大鼠的主动和被动回避反应潜伏期手术前后变化值与正常大鼠的数值相似，说明动物虽经过手术损伤，但未影响记忆功能。反之，大脑中动脉阻断后大鼠明显丧失记忆，主动回避次数减少，潜伏期变化值明显增加，说明产生了记忆障碍。对这些MCAO大鼠，经口服30或100mg/kg dl-芹菜甲素后，均能改善记忆障碍，表现为100mg/kg组主动回避错误次数明显减少（即主动回避次数增多）；主动和被动回避反应潜伏期变化值明显缩短。以上结果表明，dl-芹菜甲素有明显改善局部脑缺血致记忆障碍的作用。

实施例7

芹菜甲素对大鼠脑外伤的影响

动物：wistar大鼠，体重220~245g，由中国医学科学院动物中心提供。

药物：dl-芹菜甲素由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供，含量98%。淡黄色油状液体。用精制食用油配制。

方法：用重200g锥形金属物体自30cm高处自由落下，撞击大鼠左侧冠状缝后侧颅顶骨。击伤后5min口服dl-芹菜甲素240mg/kg，于24小时后打分评定行为变化。打分标准如下：

（1）翻正反射消失者为3分；（2）置大鼠于网

上，使鼠与网呈垂直角度，即用前肢攀吊在网上，无攀举者为3.0分（0-3）；（3）健侧前肢肩内收，屈曲者为3（0~3）分；（4）牵拉双前肢，无力者3（0-3）分；（5）推左或右肩，无阻力者3分（0-3）。满分15分，正常大鼠0分。

结果表明，脑外伤大鼠伴有脑缺血引起的神经症状，经d1-芹菜甲素治疗后，神经症状有明显好转（表3）。

实施例8

芹菜甲素对小鼠断头引起全脑缺血脑能量代谢的影响。

脑缺血缺氧后乳酸明显升高，ATP和PCr大大下降，引起能量耗竭，以致引起了神经元功能受损。

本实施例用雄性昆明种小鼠（来源同实施例7）18-22g，每组10只，皮下注射芹菜甲素（药物同实施例7，皮下注射用tween80配成乳剂）100，150，200mg/kg及溶剂（缺血对照），共4组，于给药后30分钟断头至匀浆时间15秒作为脑缺血时间，按Folbergrova（Folbergrova J. et al., J Neurochem 1972; 19: 2497）及Lowry（Lowry OH and Passonneau JV A flexible system of enzymatic analysis New York:

Academic Press, 1977) 法进行离心提取并用酶学法测定乳酸 (紫外分光光度计法), **ATP**和**PCr** (荧光分光光度计) 含量。

结果显示, 溶剂对照组脑乳酸含量上升, **ATP**和**PCr**下降; 皮下注射芹菜甲素**200mg/kg**, 30分钟后断头, 测得乳酸含量明显下降, 而**ATP**和**PCr**含量则明显上升 (表4)。这一结果提示芹菜甲素具有改善缺血脑能量代谢的作用。

实施例 9

芹菜甲素对全脑缺血大鼠的缺血期及重灌期纹状体细胞外液腺苷, 肌苷, 次黄嘌呤、黄嘌呤含量的影响

脑缺氧缺血, 引起脑能量代谢耗竭, **ATP**降解代谢产物如腺苷 (**Ade**), 肌苷 (**Ino**), 次黄嘌呤 (**Hyp**) 和黄嘌呤 (**Xan**) 聚增, 尤在重灌期, 在黄嘌呤氧化酶存在下, **Hyp**转变为**Xan**和尿酸时产生大量氧自由基。此外, 兴奋性氨基酸 (**EAA**) 和**DA**大量释放, **EAA**激活其受体门控通道使 Ca^{2+} , Na^{+} 内流, K^{+} 出胞, 使神经细胞肿胀, 细胞内 Ca^{2+} 超负荷, 导致细胞损伤或死亡。为动态检测脑缺血或重灌期特定脑区细胞外液嘌呤代谢物, **EAA**和**DA**的含量, 本研究采用4动脉 (双侧颈及椎动脉) 结扎的全脑缺血大鼠模型。

d1 - 芹菜甲素 (来源同实施例1) 用**2% Tween80**配成乳剂。

雄性Wistar大鼠（来源同实施例1），体重280-350g，水合三氯乙醛麻醉（350mg/kg ip）。采用Pulsinelli法（Pulsinelli WA and Brierley JB, A new model of bilateral hemispheric ischemia in the anesthetized rat stroke 1979; 10: 267），行4-动脉（双侧颈和椎动脉）结扎。借助立体定位仪将微灌流针插入右侧纹状体，用人工脑脊液灌流，流速 $2.5\mu\text{l}/\text{min}$ ，收集缺血（4-动脉结扎）20分钟和重灌（开放颈动脉）2小时期间灌流液若干份，每份 $20\mu\text{l}$ ，均经5% HClO_4 处理。HPLC-UV的测试条件为流动相 $10\text{mmol/L NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{OH}$ （20:1），pH3.9-4.0，流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ ，固定相：C18-硅胶， $10\mu\text{m}$ UV254nm，进样量为 $20\mu\text{l}$ 。色谱系统由恒流泵（510型Waters, USA），紫外检测器（SPD-6AV, Shimadzu, Japan），积分仪（3394A惠普）组成。dl-芹菜甲素剂量为20和40mg/kg i. p. 结果如图8所示，表明芹菜甲素能抑制缺血和重灌期纹状体细胞外液腺苷，肌苷，次黄嘌呤和黄嘌呤的升高，说明芹菜甲素能改善ATP再合成（抑制腺苷升高）和降低氧自由基的产生（缺血重灌期次黄嘌呤是产生氧自由基的底

物)。

用HPLC-EC动态检测缺血期灌流液中多巴胺(DA)的含量。测试条件为固定相YWG-CH₁₈ 10 μ m, 流动相为0.1mol/L柠檬酸, 0.1mol/L醋酸缓冲液, pH3.7, 去离子水配制内含甲醇10%, 离子对B1.2mmol/L, 正丁胺1.3mmol/L, 色谱柱为0.46 \times 25cm PE, 色谱条件为流速1.2ml/min, 工作电压0.75V, 进样量20 μ l, 于缺血前20min腹腔注射芹菜甲素40mg/kg, 收集缺血前后灌流液, 观察给药组与对照组之间DA含量的差别。结果表明芹菜甲素能降低缺血期纹状体细胞外液DA的升高, 说明芹菜甲素对脑缺血有保护作用(见表5)。

收集60 μ l(两个动物相同灌流期样品相加)灌流液, 用日立L-8500氨基酸自动分析仪, pH法测定灌流液中兴奋性氨基酸(EAA)含量, 结果如图9所示, 表明, 芹菜甲素能降低甘氨酸含量, 因为甘氨酸是NMDA受体的变构激动剂, 能增加EAA与其受体的亲和力, 所以该作用表明, 芹菜甲素能减少EAA的兴奋毒作用, 因此有脑保护作用。

由上述实验结果可知, 腹腔注射芹菜甲素20mg/kg或40mg/kg后, (1)嘌呤类化合物如Ad_e, Ino, Hyp和Xan明显下降; (2)DA和DOPAC(DA代谢产物)明显下降; (3)甘氨酸浓度下降。这一结果说明: 缺血重灌期Hyp在黄嘌呤

氧化酶存在下，转变为**Xan**和尿酸时产生大量毒性氧自由基，造成神经元细胞膜严重损伤，而芹菜甲素的这一对抗嘌呤代谢物的升高作用，提示对缺血性神经元损伤有保护作用；细胞外多巴胺增加被认为是一种缺血性脑损伤的指征，而芹菜甲素能降低其升高，提示它对缺血性脑损伤有保护作用，甘氨酸是**NMDA**亚型受体的变构激动剂，能增加**EAA**对**NMDA**受体的亲合力，增加该受体通道开放的频率，因此，芹菜甲素降低甘氨酸浓度的这一作用对脑损伤的保护是非常有利的。

实施例 10

芹菜甲素对脑卒中病人的治疗作用

药物：**d1** - 芹菜甲素由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供。

d1 - 芹菜甲素制成软胶囊制剂，每丸含**d1** - 芹菜甲素**100mg**和精制食用油**400mg**，后者为赋形剂。

病例：

19例脑卒中患者，男性**10**例，女性**9**例。年龄**45~70**岁。病程均为急性期（发病后**1-4**天）。

临床观察指标：

(1) 肌力测定仪，共分**5**级，作为神经功能的指标；

(2) 长谷川式检查，作为精神功能的指标；

(3) 临床实验室指标：主要为**CT**扫描检查，其

它检查如**EEG**，血液流变学等。

服药方式：

病人自入院后及服药后2周分别检测上述指标，以判断服药前后病情有否改善。

每例病人在上述指标检查后每天服用 **d1-芹菜甲素 600mg**，分三次服用，每次2丸，疗程为14天。

结果：

经服用二周后，病情普遍减轻或好转。由**CT**扫描结果判断，脑梗塞体积由给药前的 $11.2 \pm 5.0 \text{ cm}^3$ 降低至 $3.2 \pm 1.5 \text{ cm}^3$ ，经统计处理 $P < 0.01$ ；肌力普遍增加，比服药前增加3~5倍（ $P < 0.01$ ）。长谷川式检查也有明显改善。病人入院时均卧床不起，经二周治疗后，基本上均可行走或由人挽扶行走。由以上结果表明，**d1-芹菜甲素**对脑卒中病人的治疗有明显的改善作用。

实施例 11

芹菜甲素软胶囊配方与配制

（按1000粒投料计算）

配方：

原、辅料	用量
芹菜甲素（来源同实施例1）	100克
植物油（市售）	350克
BHT	1.35克

配制：将**BHT**溶于植物油中（超声波溶解），再

与芹菜甲素混合均匀，分装于**450mg**软胶囊中即可。

检测结果表明，该制剂稳定性良好，稳定期可达两年以上。符合中国药典**90**版（二部）附录中关于胶囊剂的要求。

下面通过芹菜甲素的急性毒性试验、致畸、致突变试验说明该化合物对哺乳动物及人类的毒性。下述实验都是按照中华人民共和国卫生部“新药审批办法”中所规定的方法进行的。所用的芹菜甲素为**d1-芹菜甲素**，由中国医学科学院药物研究所北京协和药厂提供，淡黄色油状液体，含量**98%**，口服给药用精制食用油配成，腹腔注射用**2%Tween80**配成乳剂。

实验例 1

小鼠急性毒性试验

口服：

$$LD_{50} = 3.19 (2.23 \sim 3.85) \text{ g/kg}$$

腹腔注射：

$$LD_{50} = 296 (155 \sim 354) \text{ mg/kg}$$

实验例 2

大鼠的急性毒性试验

口服：

$$LD_{50} = 2.79 (2.41 \sim 3.45) \text{ g/kg}$$

腹腔注射 $DL_{50} = 592.0 (513 \sim 680) \text{ m}$

g/kg

实验例 3

致畸胎试验

动物：**Wistar**大鼠由中国医学科学院动物研究中心提供，雌鼠为未经产鼠，体重**180~280g**，雄鼠体重**280~320g**。

灌胃给药，分**100**和**400mg/kg**两个剂量组。

结果：药物对母鼠没有明显毒性，在给药期间无体重下降，流产及死亡现象，对胚胎和胎鼠发育无明显影响。未发现外观畸形胎鼠，骨骼检查未见异常。

实验例 4

芹菜甲素的致突变实验

用微生物回复突变试验，啮齿类动物微核试验和中国仓鼠肺细胞（**CHL**）染色体畸变试验表明**d1-芹菜甲素**对以上的实验均呈阴性反应。

实验例 5

大鼠口服**d1-芹菜甲素**（6个月）的毒性试验

动物：6周龄**Wistar**大鼠**160**只，雌雄各半，分**4**组，每组**40**只。

药物剂量分高、中、低三组：**500**，**250**和**120mg/kg**，给药体积**1.0ml/kg/天**。给药时

间为 180 天。

方法：按新药审批办法及有关法规观察所有检查项目。

结果 dl-芹菜甲素给大鼠连续灌胃 6 个月，仅见高、中剂量组大鼠的体重，高中、低剂量组的血糖和高、中剂量组大鼠的胆固醇与对照组相比有显著差别；高中剂量组大鼠的个别脏器系数与对照组大鼠相比也有显著差异。在停药后恢复期结束时，各剂量组所检测的各项指标均在正常范围内。表明 dl-芹菜甲素有其安全范围，如临床用药剂量恰当，则安全无毒。

表1 芹菜甲素对大鼠中动脉结扎大鼠脑水含量的影响

分组	剂量 (mg/kg)	途径	脑半球含水量(%)	
			左侧	右侧
假手术组	--		78.41 ± 0.20	78.51 ± 0.30
溶剂对照	--	PO	78.44 ± 0.31	80.97 ± 0.79 ^{###}
芹菜甲素	80	PO	78.44 ± 0.36	80.14 ± 0.56 ^{**}
	160	PO	78.54 ± 0.34	79.98 ± 0.83 ^{**}
	240	PO	78.40 ± 0.18	79.05 ± 0.48 ^{**}
尼莫地平	6	SC	78.65 ± 0.32	79.99 ± 0.88 [*]

平均值 ± 标准差, 每组动物数为8只. ^{###} p<0.001 与假手术组比较, ^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001 与溶剂对照组比较. 左侧为非缺血侧, 右侧为缺血侧.

表2 芹菜甲素对大鼠中动脉结扎大鼠脑阳离子浓度的影响

分组	剂量 (mg/kg)	途径	脑半球阳离子浓度($\mu\text{mol/g}$ 干重)			
			钠离子		钾离子	
			左侧	右侧	左侧	右侧
假手术组	--		255.7 \pm 7.2	260.2 \pm 7.9	484.1 \pm 4.1	482.2 \pm 4.8
溶剂对照	--	P0	259.2 \pm 15.1	349.3 \pm 15.7###	484.8 \pm 4.3	436.9 \pm 11.3###
芹菜甲素	80	P0	255.9 \pm 7.8	317.0 \pm 27.0**	485.5 \pm 4.8	452.2 \pm 13.7**
	160	P0	263.4 \pm 14.8	315.7 \pm 37.1**	481.1 \pm 7.2	456.3 \pm 19.2**
	240	P0	253.4 \pm 5.3	272.8 \pm 18.9***	485.0 \pm 2.2	473.6 \pm 7.9***
尼莫地平	5	SC	274.4 \pm 16.9	313.9 \pm 41.3**	481.8 \pm 5.2	453.4 \pm 14.5**

平均值 \pm 标准差, 每组动物数为8只. ### $p < 0.001$ 与假手术组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
 *** $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较. 左侧为非缺血侧, 右侧为缺血侧.

表3. dl-芹莱甲素对头外伤大鼠的影响 ($\bar{X} \pm SD$ $n=10$)

药 物	剂 量 (mg/kg)	途 径	行 为 评 分
溶剂对照	--	po	9.0 \pm 2.5
dl-芹莱甲素	240	po	3.4 \pm 1.0***

*** $p < 0.001$.

表4 芹菜甲素对小鼠断头引起全脑缺血能量代谢的影响

药物	剂量 (mg/Kg S.C.)	乳酸 ($\mu\text{mol/g}$)	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	磷酸肌酸 ($\mu\text{mol/g}$)
缺血对照	-	14.0 ± 3.6	0.60 ± 0.14	3.90 ± 1.49
芹菜甲素	100	11.0 ± 1.2	0.65 ± 0.14	5.14 ± 1.40
	150	$10.0 \pm 1.2^*$	-	5.50 ± 1.42
	200	$9.6 \pm 3.0^*$	$0.98 \pm 0.30^*$	$7.64 \pm 1.55^{**}$

n=7, 平均值±标准差: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 与缺血对照组比较

表5 芹菜甲素 (40mg/Kg i. p.) 对全脑缺血大鼠纹状体灌流液中多巴胺 (DA) 及其代谢物 (DOPAC) 浓度的影响

	DA (ng/ml)		DOPAC (ng/ml)	
	缺血前	缺血	缺血前	缺血
溶剂对照	4.11±0.45 (n=5)	19.20±3.69** (n=5)	15.0±2.54 (n=7)	12.75±1.56 (n=7)
芹菜甲素	5.60±0.89 (n=6)	4.44±3.02## (n=6)	10.6±0.94 (n=5)	5.60±1.30## (n=5)

平均值±标准差: ** p<0.01 与缺血前比较

p<0.05, ## p<0.01 与溶剂对照组比较

说明书附图

平均值±标准差:

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较

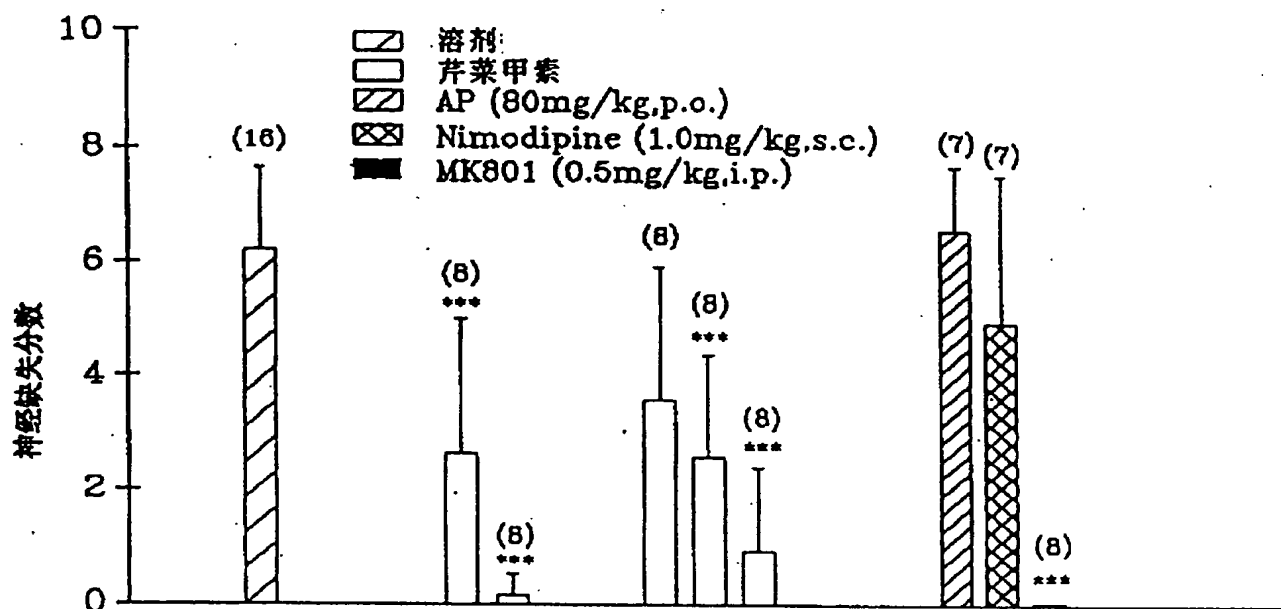


图1A

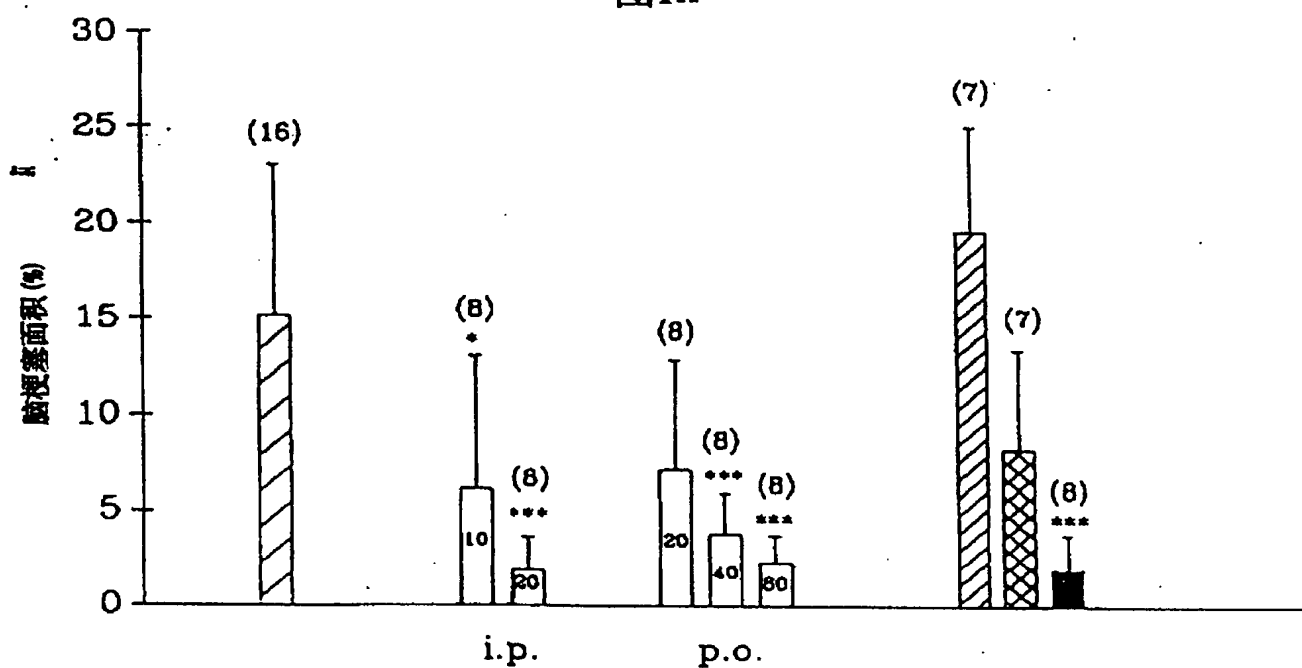


图1B

平均值±标准差:

*** $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较

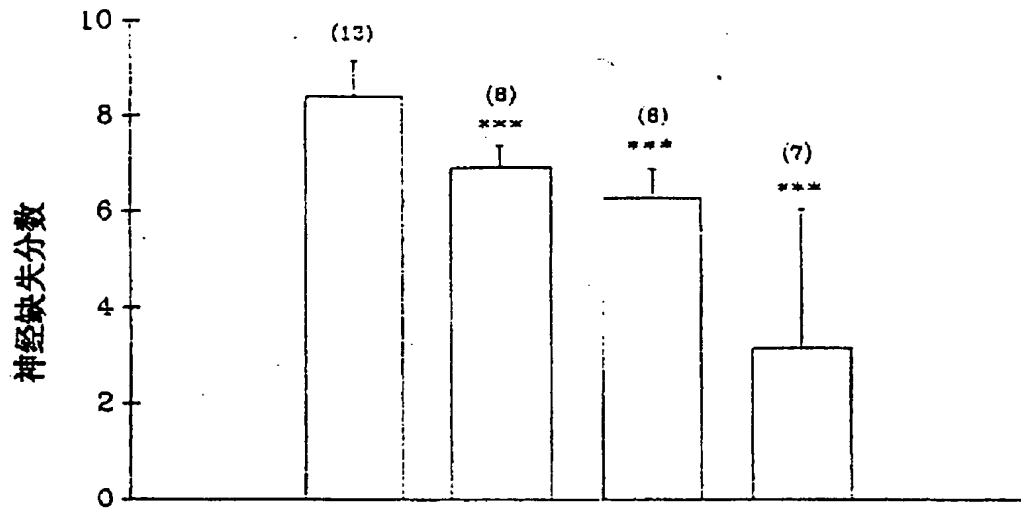


图2A

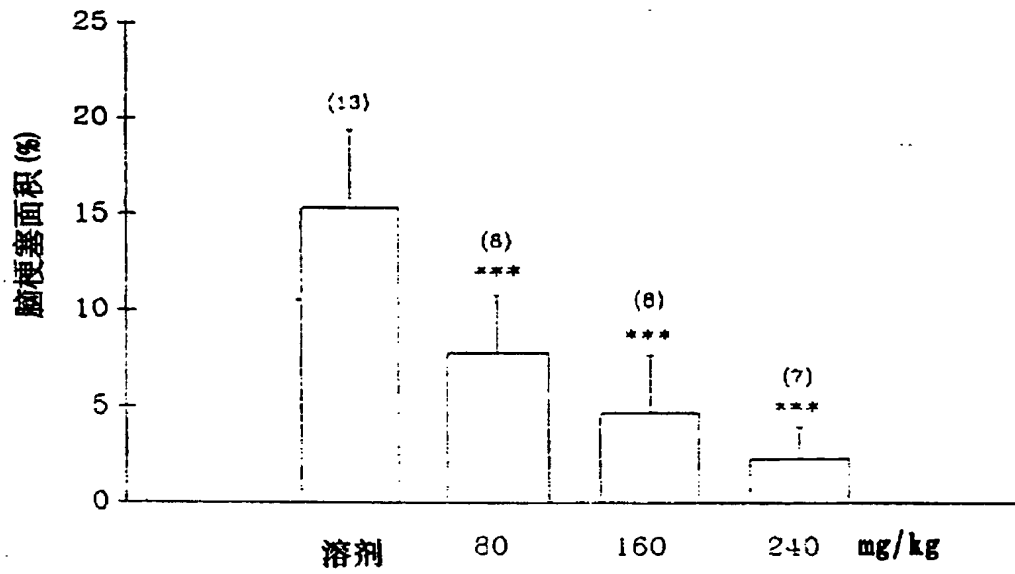


图2B

平均值±标准差:

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较

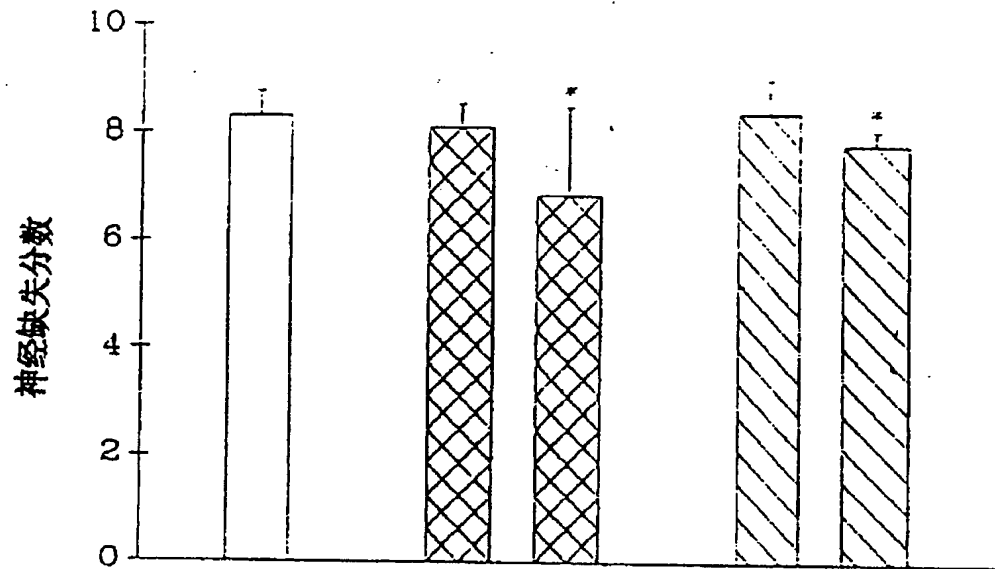


图3A

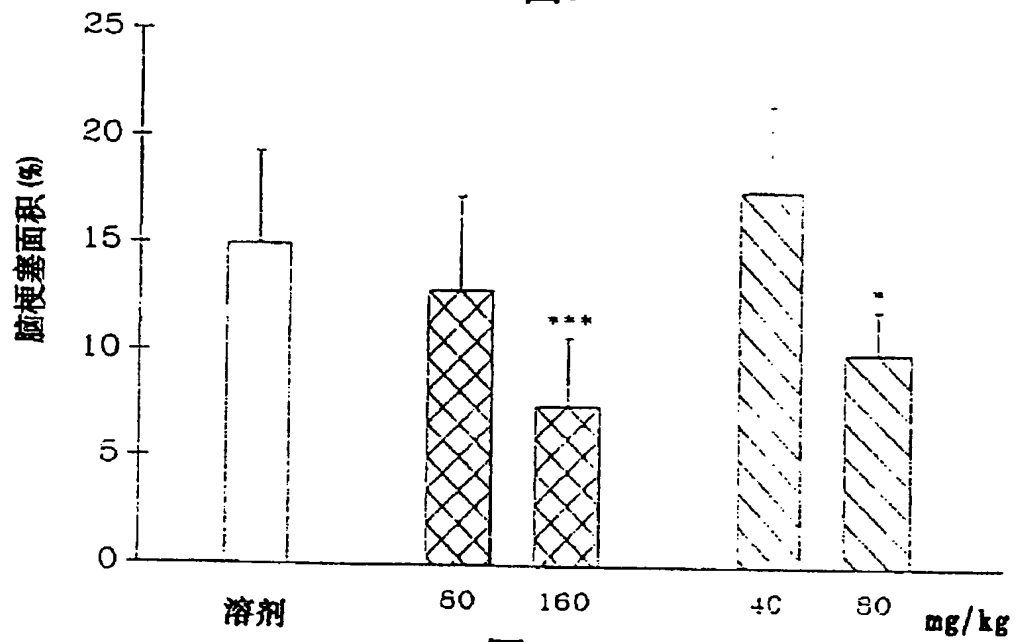


图3B

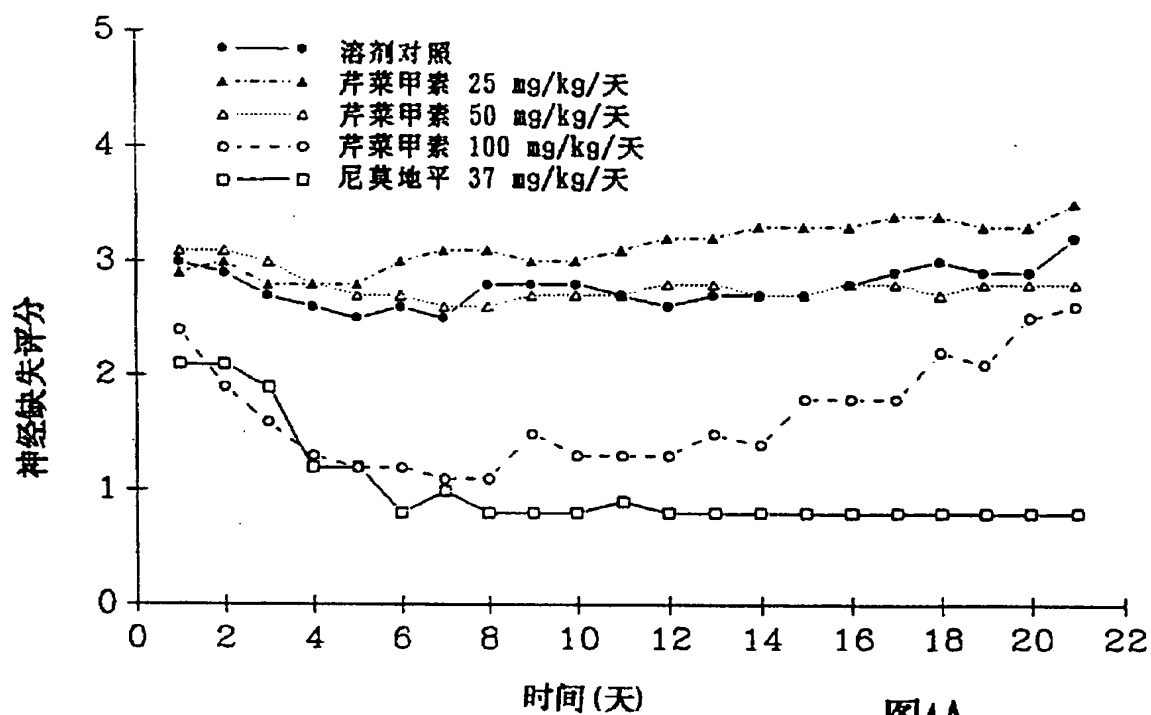


图4A

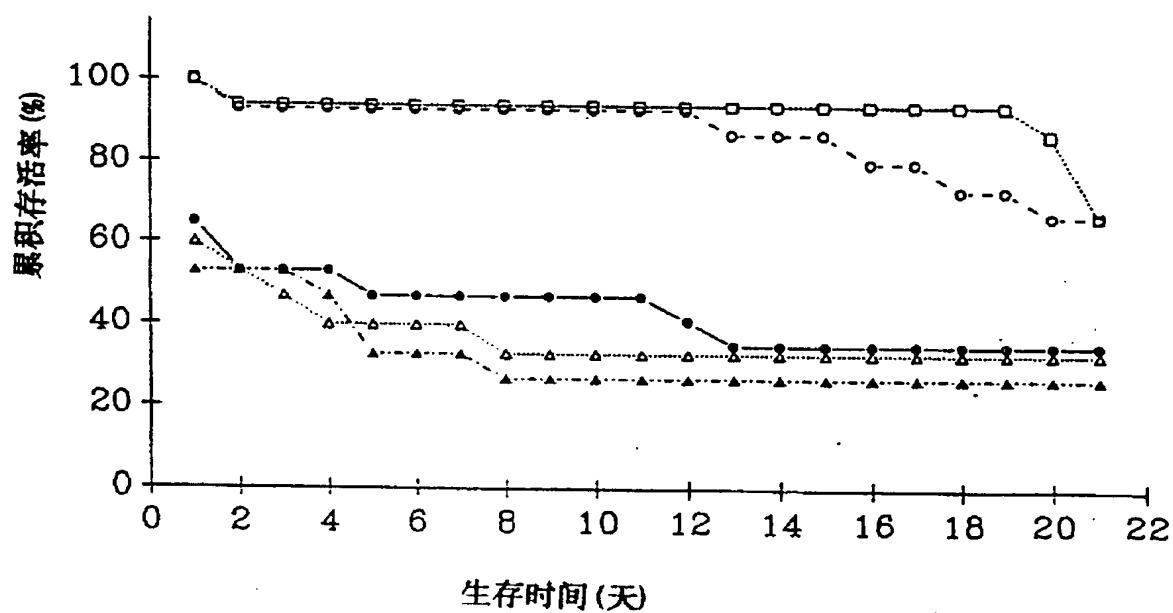


图4B

平均值±标准差: (每组动物为16只)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较

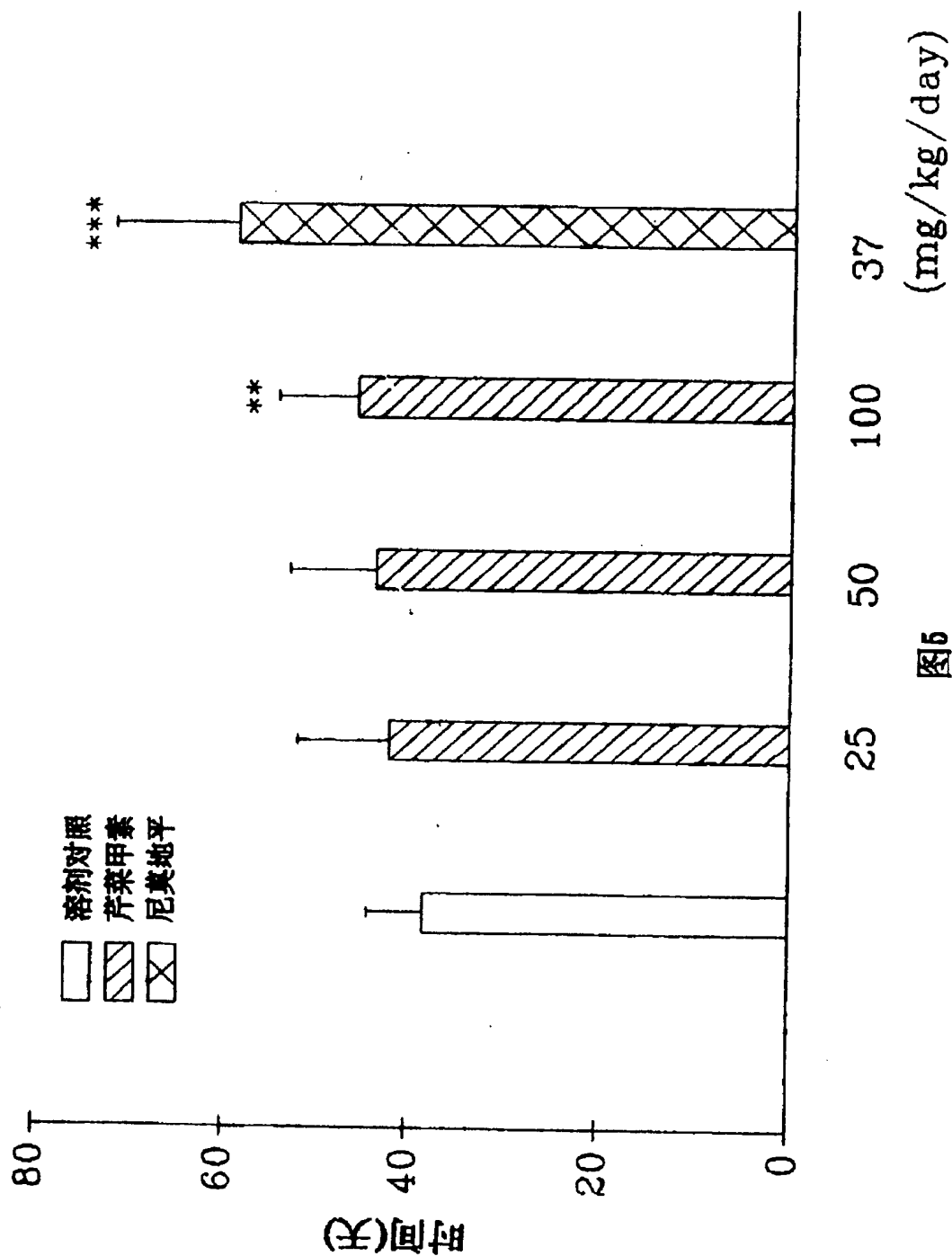


图5

平均值±标准差: (每组动物为8-10只)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 与MCAO组比较;

$p < 0.001$ 与假手术组比较

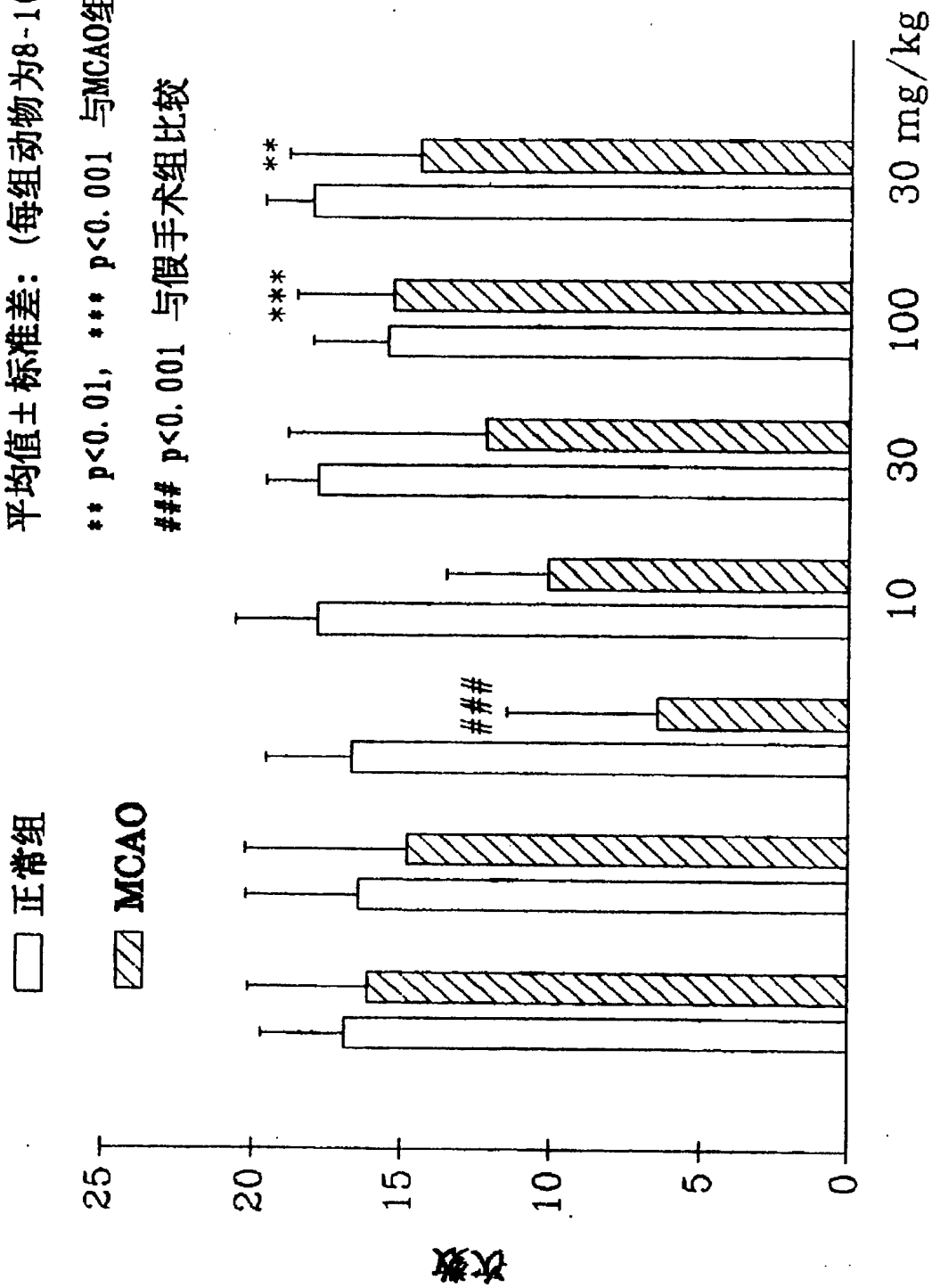


图6

平均值 ± 标准差: (每组动物为8-10只)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 与MCAO组比较;

$p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 与假手术组比较

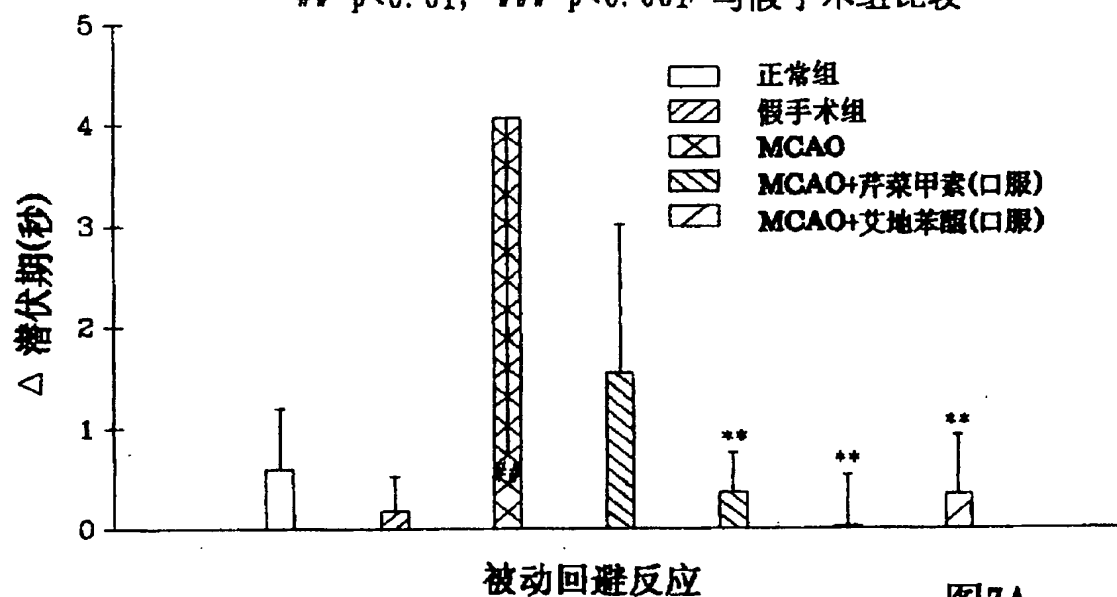


图7A

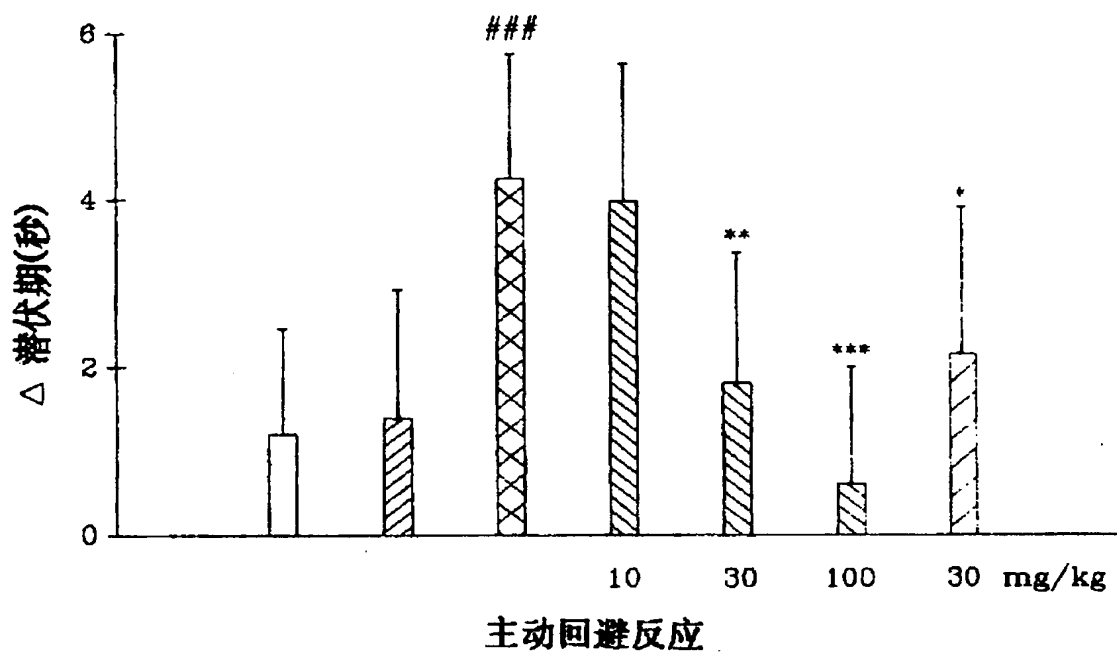


图7B

平均值±标准差: (每组动物为6只)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 与缺血前的值比较;

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 与溶剂对照组比较

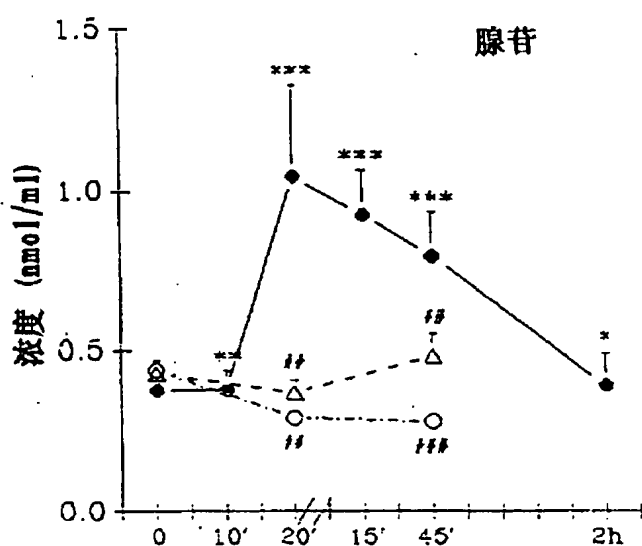


图8A

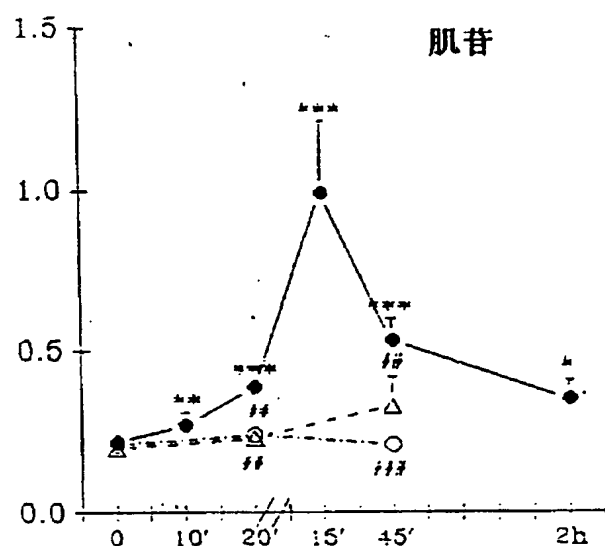


图8B

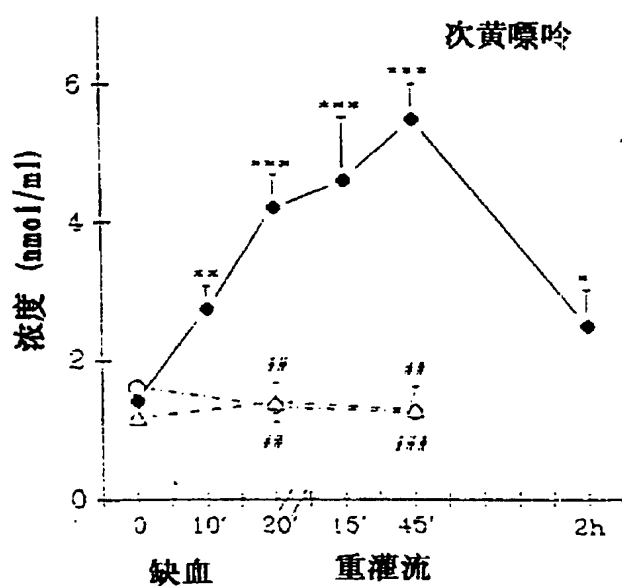


图8C

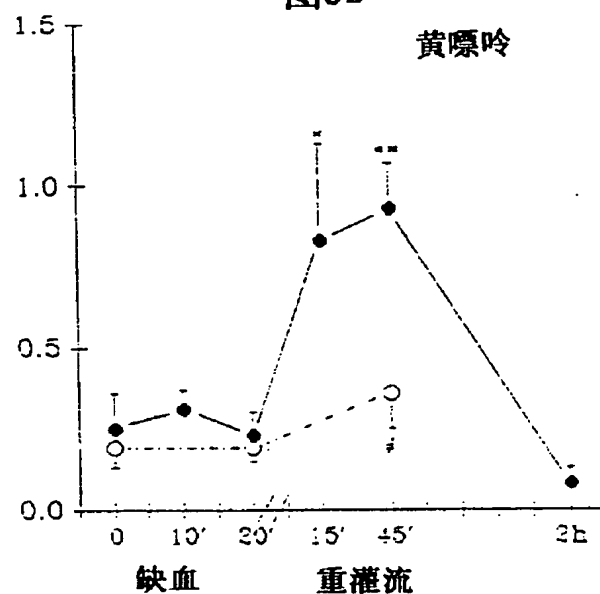


图8D

平均值 ± 标准差: (每组动物为6只) * $p < 0.05$

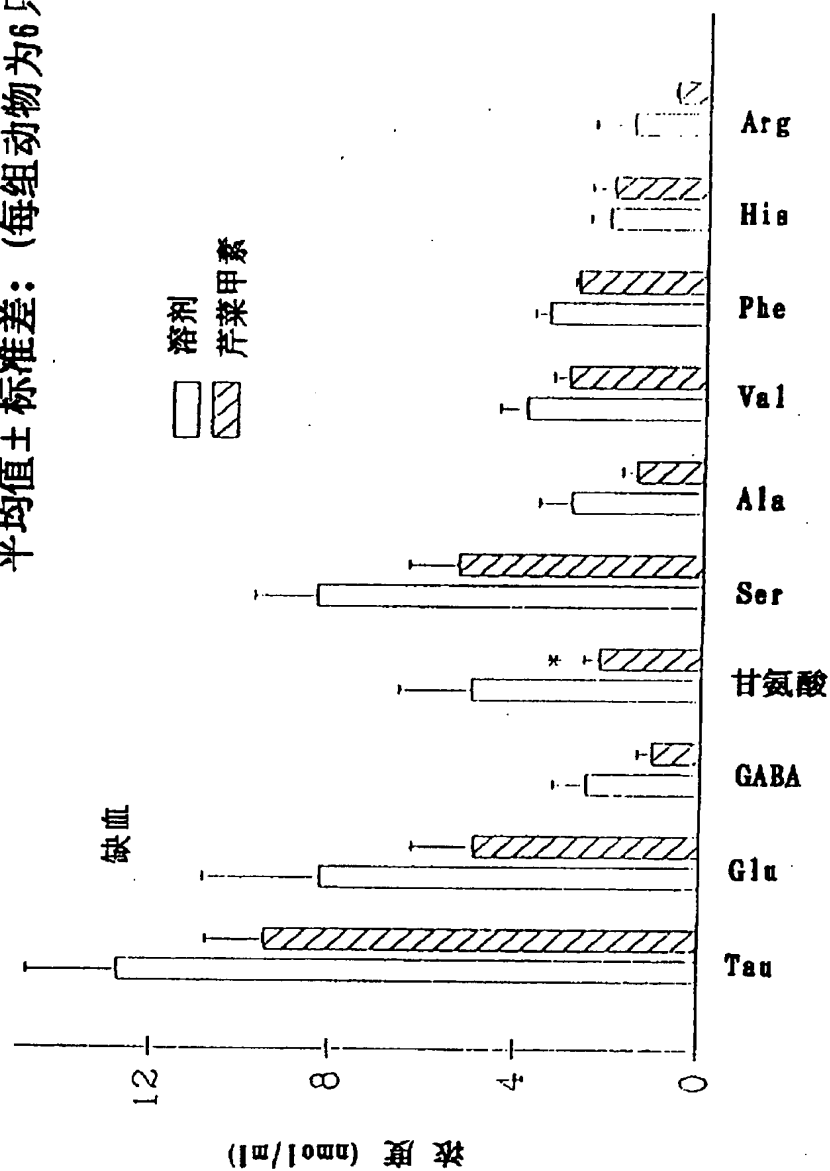


图9

Abstract of CN1100097

The apiolin-A can effectively prevent and treat the diseases caused by cerebral ischemia, especially having the protecting action to ischemic cerebral neuron damage and necrosis.